The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	配列特異的酵素活性相補法による癌の新規治療法の開発
Author(s)	藤井, 穂高
Citation	癌と人. 2011, 38, p. 48-49
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/20159
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

配列特異的酵素活性相補法による癌の新規治療法の開発

藤　井　穂　高*

従来の癌の化学・放射線・免疫療法は，癌細胞と正常細胞との生物学的違い（例えば，癌細胞の方が盛んに増殖する，等）を利用して行われていますが，そうした違いはわずかなものが多く，また，他の正常細胞と共通の性質も認められるため，必ずしもうまくいっているとは言い難い状況にあります。例えば，抗癌剤治療により，癌細胞も死にますが，同時に正常細胞までも死んでしまうため，患者さんが重篤な副作用に苦しむことも多いです。それでは，癌細胞だけを殺すにはどうしたら良いか，という問いが，本研究課題の出発点です。結論として，癌細胞には存在するが，正常細胞には存在しない遺伝子 DNA 配列の違いを検出して，これを目印として細胞死を誘導すればいいのではないか，という発想に至りました。

これまでの研究により，癌遺伝子の活性化変異や癌抑制遺伝子の抑制変異が蓄積することによって，癌化が引き起こされることが明らかになってきました。こうした変異を認識する分子プローブを用いることにより，癌細胞と正常細胞とを明確に区別することが出来ると考えます。変異配列を認識するようなプローブとしては (1) DNA 結合蛋白，(2) RNA 等を用いたアプタマー，(3) DNA もしくはより安定な Locked Nucleic Acid (LNA) 等が考えられます。このうち，生体内での安定性が高いと思われる DNA 結合蛋白と LNA を用いて研究を進めています。

DNA 結合配列を用いる方法では，Zn フィンガー型 DNA 結合蛋白を，系統的に改変することによって，標的 DNA 配列を認識する DNA 結合蛋白を，自由度高く設計することが可能になってきています。特異的に DNA 配列を認識させ，DNA 配列特異的に細胞死を誘導するためには，配列特異的酵素活性相補法を用います。この方法は，特定の DNA 配列が存在するときにのみ，酵素サブユニットが二量体を形成し，酵素活性が現れるという原理に基づきます。相補させる酵素としては，細胞死を誘導するような活性を持っているものであれば良いと思われ，候補として，二量体形成により活性化され細胞毒性の高い DNA の二重鎖切断を導入する DNase 等が挙げられます。変異配列が存在する癌細胞内でのみ二量体を形成させることで，癌細胞のみを殺すことが可能であると考えます。具体的には，(1) 癌細胞で認められる点突然変異を含む領域，(2) その近傍，の二カ所に結合する二種類の DNA 結合蛋白を設計し，それぞれに遺伝子組み換え技術を用いて，細胞膜貫通ペプチドと DNase の触媒ドメインを融合させる。(1) に結合する DNA 結合蛋白は，正常細胞の対応する DNA 配列には結合しないように設計する。癌患者に上記の DNase 融合型 DNA 結合蛋白を投与すると，癌細胞内でのみ (1) 及び (2) に結合する融合蛋白同士の二量体が形成され，その活性によりゲノムが切断される。同時に，DNA 修復阻害剤を投与することにより，ゲノムの切断された癌細胞ではアポプトーシスが誘導される。というスキームを考えています。

現在，モデル系として，細菌の DNA 結合蛋白である LexA の結合配列をゲノム中に組み込んだ細胞と対照細胞を用いて実験を行っています。既に，LexA DNA 結合ドメインと DNase の活性ドメインとの融合蛋白を作製しました。また，これまで試験官内では単独で活性を持つ蛋白は出来ないと言われていたある種の DNase についても，活性を持つこと示しました。また，LexA DNA 結合ドメイ

ンと DNase の活性ドメインとの融合蛋白発現ベクターを構築しました。加えて，*in vitro* transcription の系により，LexA DNA 結合ドメインと DNase の活性ドメインとの融合蛋白をコードする mRNA の発現系を構築しました。

現在，LexA DNA 結合ドメインと DNase との融合蛋白が細胞に与える影響を，(i) 組換え蛋白質の導入，(ii) レトロウイルスベクターによる恒常的発現，(iii) プラスミドのトランスフェクションによる一過性発現，(iv) *in vitro* transcription の系を用いて合成した RNA の導入，といった種々の系を用いて検討を行っています。

副作用の無い癌の根治術の開発は，現時点での人類の夢の一つです。本研究では，癌細胞と正常細胞の DNA 配列の違いを識別して，癌細胞のみを除去する方法の開発を目指しています。このような癌の治療戦略は，これまでにない新しいものであり，もとより，一朝一夕では完成することができません。本提案を臨床応用するために必要な技術には，レトロウイルス感染細胞や癌細胞と正常細胞の遺伝子配列の違いを検出する技術が必要ですが，近年の次世代シークエンス技術の発展により，細胞の持つ全ゲノム情報の決定が，極めて短時間で得られるようになってきています。また，癌細胞では，癌の種類により高頻度の変異が入る遺伝子が明らかになってきており，本提案の標的配列の決定は現時点でも十分可能になっています。従って，本研究提案で開発を目指す技術の臨床への応用も，近い将来可能となると信じて研究を行っています。

最後になりますが，このような萌芽的な研究に助成をいただきましたことを心より感謝いたします。

＊大阪大学微生物病研究所
感染症学免疫学融合プログラム推進室
平成 21 年度一般学術研究助成金交付者